

토끼를 이용한 가용화 플루오로메톨론 점안제의 효능 연구

류재국
동남보건대학교 식품제약과

Efficacy Study of Solubilized Fluorometholone Eye Drop Formulation Using Rabbits

Jae-Kuk Ryu

Department of Food and Pharmaceutical Science, Dongnam Health University

요약 플루오로메톨론 성분은 시중에 현탁제 제형으로 점안제가 시판되고 있다. 본 연구의 목적은 플루오로메톨론을 가용화시킨 점안제에 대하여 효능을 확인하는 것이다. 본 연구는 토끼의 안구에 대하여 시험물질의 처치가 안구에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다. 시험물질 투여 전 체중을 측정된 결과, 모든 시험군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. ELISA analysis 검사 결과, 플루오로메톨론 가용화제 투여군의 IL-1 β 및 TNF- α 수준은 유발대조군보다 유의하게 낮은 것으로 나타났고, PGE2 수준은 유발대조군 대비 낮은 수준을 나타내었다. 조직병리학적 검사 결과, 모든 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, 플루오로메톨론 가용화제 투여군의 수준은 유발대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났다. 본 시험조건하에서 각막에 손상을 가한 토끼에 시험물질 플루오로메톨론 가용화제 투여하였을 때, ELISA 및 조직병리학적 검사 결과, 유발대조군 대비 IL-1 β 및 TNF- α 수준의 유의한 감소를 나타내었으며, 유의한 차이는 아니었으나, 각막 내 PGE2 수준과 조직병리학적 검사 결과에서 유발대조군에 비하여 낮은 경향을 나타내었다. 따라서, 플루오로메톨론 가용화제제는 각막에 손상을 가한 토끼에 대하여 염증 억제 효과가 있는 것으로 사료되며, 그 효력은 후메론 점안액 0.02 %와 동등 수준으로 사료된다.

Abstract Fluorometholone suspensions are commercially available in eye drops. To confirm the efficacy of eye drops containing solubilized fluorometholone, this study evaluated the effects after exposing afflicted rabbit eyes to the test substances. Prior to initiating the study, it was confirmed that there was no significant difference in the body weight of all experimental group animals. The fluorometholone solubilization test substance was administered to rabbits with corneal damage. Compared to the induced control group, ELISA and histopathological examination revealed significantly reduced levels of IL-1 β and TNF- α in the test groups. Although not significantly different, the level of PGE2 in the cornea and on histopathological examination showed a tendency to be lower than the induced control group. Our results indicate the anti-inflammatory potential of fluorometholone solubilizing preparation in rabbits with corneal damage. The obtained efficacy is considered to be equivalent to 0.02% Fumeron eye drops.

Keywords : Efficacy, Eye Drop, Fluorometholone, Solubilization, Rabbits

본 연구는 동남보건대학교 연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

*Corresponding Author : Jae-Kuk Ryu(Dongnam Health Univ.)

email: jkrmoon@daum.net

Received January 6, 2023

Accepted March 3, 2023

Revised February 6, 2023

Published March 31, 2023

1. 서론

안과용 약물을 눈에 적용하는 가장 일반적인 방법은 점안제를 눈에 직접 투여하여 적용하는 것이다. 점안제는 전안부 장애에 사용하는 일반적인 제제이다. 그러나, 눈 표면에 도포 후 0.5 분 ~ 1 분 이내에 눈물 때문에 씻겨 나간다[1]. 따라서, 안구 표면에서 약물의 효과가 지속되는 시간은 짧다[2]. 또한 눈의 구조적 특징으로 인해서 약물을 원하는 부위에 전달하기 어려워서, 투여된 약물의 생체이용률을 낮춘다. 따라서, 점안액은 눈에 투여한 양의 5 % 미만만이 영향을 미친다[3].

글루코코르티코이드의 일종인 플루오르메톨론(FMN, Fluorometholone) 성분은 안구에 항염증제로 사용된다. Dexamethasone 등의 다른 글루코코르티코이드 점안액과 다르게 FMN 사용시에는 스테로이드 성분에 의한 안고혈압이나 녹내장을 유발할 가능성이 작다[4,5]. 글루코코르티코이드 성분에 의한 안고혈압의 경우, 섬유주의 미세구조 변화를 포함하여 안구 유출 경로의 결함을 유발하여, 유출 저항이 증가하고 안압이 상승한다[6].

FMN은 염증성 질환이나 안구건조증에 사용되는 약물이다[7,8]. FMN 성분은 낮은 수용해도 때문에 용액으로 제조하기 어렵다[9]. 시중에서 입수 가능한 FMN 제형은 현탁액이다. 현탁액 제형의 FMN은 약 1 %의 낮은 생체이용률로 인해 정확한 투여량 전달이 어렵다[10]. 따라서 원하는 약효를 얻기 위한 과량 투여로 인해 안압 상승 등의 부작용이 유발될 수 있다[11].

안구의 특이한 구조로 인한 낮은 생체이용률을 극복하고 난용성 약물의 용해도를 높이기 위해 여러 가지 안구 약물 전달 시스템이 연구되고 있다[12-14]. 현재까지 에멀전, 안연고, 현탁액제, 하이드로겔, 나노입자, 리포솜, 안구 삽입물 및 콘택트렌즈 제제 등의 여러 제형이 안구 약물 투과 장벽을 극복을 위한 약물 전달 시스템으로 연구되었다[13,15-17]. 그중에서 미셀은 제조 과정이 상대적으로 간단하고, 난용성 약물을 가용화시켜 투명한 제제를 만들 수 있다[16].

본 연구의 목적은 FMN 현탁액을 가용화시킨 제제에 대하여 효능을 확인하는 것이다. FMN 점안제의 효능 연구는 토끼에서 수행되어왔다[18]. 본 시험에 사용하는 토끼는 각종 약효 및 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 이러한 자료를 이용하여 시험결과 해석 및 평가가 용이하기 때문에 선택하였다. 본 연구는 토끼의 안구에 대하여 시험물질의 처치가 안구에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였

다. 시험물질 투여 전 체중을 측정하여 모든 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않는 것을 확인하고 연구를 수행하였다. ELISA analysis, IL-1 β , TNF- α , PGE2에 대한 비교를 하였다. 조직병리학적 검사를 통하여 각막에 손상을 가한 New Zealand White Rabbit에 대하여 염증 억제 효과를 비교하였다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 재료

FMN 가용화 제제연구시 이용한 원료는 한림제약에서 제공받아 사용하였다. 시험물질인 FMN 가용화제제 6의 조성은 다음과 같다(Table 1). 제제 6을 시험의 재현성 확인을 위해 3회 조제하였다(6-1 ~ 6-3). 그중 제제 6-1을 사용하였다. 대조물질인 후메론 점안액 0.02 %는 시판품을 사용하였다.

Table 1. Formulation 6

Purpose	Ingredient name	Amount (per mL)	Formulation 6-1 (1000 mL)	Formulation 6-2 (1000 mL)	Formulation 6-3 (1000 mL)
Active ingredient	FMN	0.2 mg	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Buffering agent	Sodium dihydrogen phosphate	0.6 mg	0.6 g	0.6 g	0.6 g
	Sodium hydrogen phosphate hydrate	6.0 mg	6.0 g	6.0 g	6.0 g
Emulsifier	Polysorbate 80	0.3 mg	0.3 g	0.3 g	0.3 g
Emulsifier	Captisol	125.0 mg	125 g	125 g	125 g
Stabilizer	Sodium edetate	0.1 mg	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Preservative	BKC	0.05 mg	50 mg	50 mg	50 mg
Water for injection	quantum sufficient mL		1000 mL	1000 mL	1000 mL
Filtration process		0.2 um PES	0.2 um PES	0.2 um PES	0.2 um PES

2.2 실험동물 및 사육환경

New Zealand White Rabbit은 한림실험동물(경기도 화성시 봉담읍 유리)에서 수컷 18 마리를 제공하였다. 입수 후 7 일간 순화기간을 거치고, 그동안 일반증상을 관찰하여 건강상태를 확인하고 건강한 동물을 시험에 사

용하였다. 투여개시시 체중범위는 평균체중 (kg) \pm 20 % 이하로 하였다. 동물의 귓바퀴에 유성매직펜으로 동물 번호를 기재하여 식별하였다. 사육상자에는 색으로 구별 되는 개체식별카드를 부착하였고, 사육실 입구에는 동물 실 사용기록지를 부착하였다.

본 시험은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간 (오전 8 시 점등~오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 주식회사 노터스 비설치류 사육구역 3 호실에서 실시하였다. 사육기간 중 동물실의 온습도, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 주 1 회 측정하였다. 환경측정 결과 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다. 사료는 (주)카길애그리퓨리나 (경기도 성남시 분당구 구미동 7-1번지 한림원빌딩)에서 생산하는 실험동물용 사료를 드림바이오 (서울특별시 광진구 광나루로 507)로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 폴리카보네이트제 음수병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 순화 및 실험 기간 동안 토끼용 스테인레스제 사육상자 (W 500 x L 800 x H 500 mm)에서 1 마리/사육상자로 사육하였다. 사육상자는 매일 청소하였으며, 물병은 매일 교환하였다. 순화기간 중 건강하고 안구의 이상이 없는 것으로 판정된 동물들의 체중을 측정하고 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하였다. 본 시험은 주식회사 노터스의 동물실험윤리위원회 승인을 받아 실시하였다.

2.3 시험군의 구성

시험군을 3 그룹으로 나누었다. G1은 후메론 점안액 0.02 % 투여군, G2는 FMN 가용화제 투여군, G3은 유발대조군으로 구성하였다. 각 군의 시험물질은 100 μ L/eye로 점안하였다.

2.4 염증 유발

Zoletil 50 (VIRBAC, France) 및 Xylazine (Rompun[®], Bayer AG, Germany)을 이용하여 동물을 마취한 뒤, 직경 3 mm 크기의 Biopsy punch 및 수술용 멸균 blade를 이용하여 양안 각막 중앙에 일정한 손상을 가하였다. 이후, 염증 유발물질 (LPS)을 200 ng/50 μ L/eye로 점안하였다.

2.5 투여

염증 유발물질 (LPS) 점안 후 30 분째에 시험물질을 양안에 1 회 점안투여하고, 2 회 추가로 점안투여를 실시하였다. 총 3 회 점안투여하였다. 보조자가 동물을 사육상자 밖으로 꺼내어 자연스럽게 보정한 후, 투여자는 피펫을 이용하여 각 시험군에 해당하는 시험물질을 양안 각막 중앙에 점안하였다.

2.6 관찰 및 검사 항목

2.6.1 체중 측정

시험물질 투여 전에 체중을 측정하였다.

2.6.2 ELISA analysis

염증 유발물질 (LPS) 투여 24 시간째에 동물을 안락사시킨 다음 우측 안구로부터 각막을 적출하여 IL-1 β , PGE2 및 TNF- α 의 함량을 ELISA assay를 이용하여 분석하였다.

2.6.3 조직병리학적 검사

동물을 안락사시킨 다음, 좌측 안구를 적출하여 10 % 중성완충포름알린용액에 고정하였다. 고정된 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 뒤, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하고, 광학현미경 (Olympus BX53, Japan)을 이용하여 염증 수준의 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

조직병리학적 검경은 이호성구의 침윤 수준을 200 배 시야에서 관찰하여 침윤 수준에 따라 0-4 점의 점수를 부여하여 군간 비교하였다.

2.7 통계학적 분석

본 시험의 결과에 대하여 모수적인 다중비교 (Parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교 (Non-parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 모수적인 다중비교의 경우, 자료의 정규성을 가정하고, 모수적 일원분산분석 (One-way ANOVA)으로 검정하였으며, 그 결과가 유의할 경우, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후검정을 실시하여 시험군간 유의한 차이를 분석하였다.

비모수적인 다중비교의 경우, Kruskal-Wallis' H-test로 검정하여, 그 결과가 유의할 경우 사후분석인 Dunn's multiple comparison test를 이용하여 시험군간 유의

한 차이를 분석하였다.

통계학적 분석은 Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 체중

시험물질 투여 전 체중을 측정한 결과, 모든 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

Table 2. Body weights (kg)

Day	G1	G2	G3
0	2.35±0.10	2.35±0.09	2.35±0.08
n	5	5	5

Data were expressed as Mean±S.D.
The day of administration was designated day 0.
G1: Fumeron eye drops 0.02 %, G2: Fluorometholone solubilization agent, G3: Vehicle control

3.2 ELISA analysis

우측 안구로부터 각막을 적출하여 ELISA 분석 실시한 결과, FMN 가용화제 투여군 (G2)의 IL-1β 수준은 유발대조군 (G3)에 비하여 유의하게 낮은 것으로 나타났으며(p<0.05), 후메론 점안액 0.02 % 투여군 (G1)의 PGE2 수준은 유발대조군 대비 유의하게 낮았고 (p<0.05), 후메론 점안액 0.02 % 투여군 및 FMN 가용화제 투여군의 TNF-α 수준은 유발대조군에 비하여 낮은 것으로(p<0.01) 관찰되었다(Table 3).

Table 3. ELISA analysis (pg/mL)

Test	G1	G2	G3
IL-1β	101.61±17.06	90.44±13.62*	126.14±21.40
PGE2	44.65±6.24*	47.36±3.55	52.71±3.50
TNF-α	614.09±68.44**	649.30±106.93**	860.05±95.74
n	5	5	5

Data were expressed as Mean±S.D.
**/* A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G3.

3.3 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사를 위하여 염증 유발물질 투여 24

시간째에 동물을 안락사시킨 다음 좌측 안구를 적출하여 이호성구(heterophils)의 침윤 정도를 200배 시야에서 관찰하여 점수화하여 비교하였다(Table 4, Fig. 1). 후메론 점안액 0.02 % 투여군 (G1) 및 FMN 가용화제 투여군 (G2)의 수준은 유발대조군 (G3)에 비하여 낮은 것으로 나타났다. 통계적으로 시험군간의 유의한 차이를 보이지 못한 것은 동물실험의 개체 수가 제한된 것이 원인일 것으로 판단한다.

Table 4. Histopathological examination by score

Day	G1	G2	G3
0	2.6±0.9	2.4±0.5	3.6±0.9
n	5	5	5

Data were expressed as Mean±S.D.

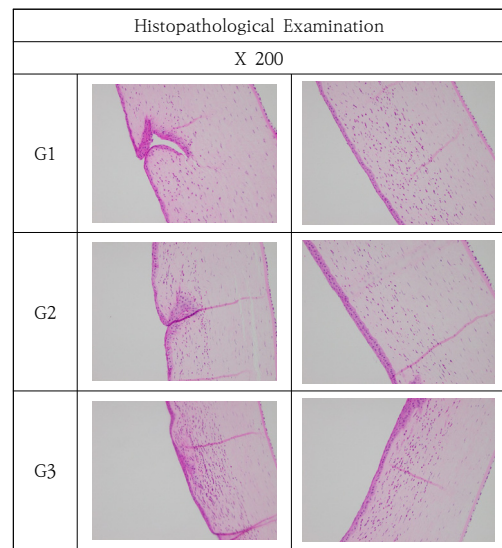


Fig. 1. Histopathological examination

4. 결론

본 연구는 토끼의 안구에 대하여 시험물질의 처치가 안구에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다(G1: 후메론 점안액 0.02 % 투여군, G2: FMN 가용화제 투여군, G3: 유발대조군).

시험물질 투여 전 체중을 측정한 결과, 모든 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

염증 유발물질 (LPS) 투여 24 시간째에 동물을 안락

사시킨 다음 우측 안구로부터 각막을 적출하여 ELISA analysis를 실시한 결과, FMN 가용화제 투여군의 PGE2 수준은 유발대조군 대비 유의한 차이를 보이지 않았으나 낮은 경향을 나타냈으며, IL-1 β 및 TNF- α 수준은 유발대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났고, 양성대조물질인 후메론 점안액 0.02 % 투여군과 유사한 수준으로 관찰되었다.

조직병리학적 검사를 위하여 염증 유발물질 투여 24 시간째에 동물을 안락사시킨 다음 좌측 안구를 적출하여 이호성구(heterophils)의 침윤 정도를 200배 시야에서 관찰하여 점수화한 결과, 모든 시험군간 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, 후메론 점안액 0.02 % 투여군 및 FMN 가용화제 투여군의 수준은 유발대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났다.

본 시험조건하에서 각막에 손상을 가한 New Zealand White Rabbit에 시험물질 FMN 가용화제 투여하였을 때, ELISA 및 조직병리학적 검사 결과, 유발대조군 대비 IL-1 β 및 TNF- α 수준의 유의한 감소를 나타내었으며, 유의한 차이는 아니었으나, 각막 내 PGE2 수준과 조직병리학적 검사 결과에서 유발대조군에 비하여 낮은 경향을 나타내었다.

따라서, FMN 가용화제 투여는 각막에 손상을 가한 New Zealand White Rabbit에 대하여 염증 억제 효과가 있는 것으로 사료되며, 그 효력은 후메론 점안액 0.02 %과 동등 수준으로 사료된다.

References

- [1] A. Urtti, "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery", *Adv Drug Deliv Rev*, vol.58, No11, pp.1131-1135, Nov. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.027>
- [2] M. Ruponen, A. Urtti, "Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery", *Eur J Pharm Biopharm*, vol.96, pp.442-446, Oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.032>
- [3] R. Gaudana, J. Jwala, S. H. S. Boddu, A. K. Mitra, "Recent perspectives in ocular drug delivery", *Pharm Res*, vol.26, No5, pp.1197-1216, May 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9694-0>
- [4] J. P. Kersey, D. C. Broadway, "Corticosteroid-induced glaucoma: a review of the literature", *Eye*, vol.20, No4, pp.407-416, Apr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/si.eye.6701895>
- [5] A.T. Al Hanaineh, D.H. Hassanein, S.H. Abdelbaky, O.M. El Zawahry, "Steroid-induced ocular hypertension in the pediatric age group", *Eur J Ophthalmol*, vol.28, No4, pp.372-377, Jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1120672118757434>
- [6] G. C. Patel, J. C. Millar, A. F. Clark, "Glucocorticoid receptor transactivation is required for glucocorticoid-induced ocular hypertension and glaucoma", *Invest Ophth Vis Sci*, vol.60, No6, pp.1967-1978, May 2019. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.18-26383>
- [7] S. C. Pflugfelder, "Antiinflammatory therapy for dry eye", *Am J Ophthalmol*, vol.137, No2, pp.337-342, Feb. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2003.10.036>
- [8] C. S. de Paiva, S. C. Pflugfelder, "Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome", *Arg Bras Oftalmol*, vol. 71(6 Suppl), No2, pp.89-95, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-27492008000700017>
- [9] T.Z. Wang, B. Guan, X.X. Liu, L.N. Ke, J.J. Wang, K.H. Nan, "A topical fluorometholone nanoformulation fabricated under aqueous condition for the treatment of dry eye", *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol.212, p.112351, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112351>
- [10] P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, "Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability", *Asian J Pharm Sci*, vol.9, No6, pp.304-316, Dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>
- [11] G. Prospero-Porta, S. Kedzior, B. Muirhead, H. Sheardown, "Phenylboronic-acid-based polymeric micelles for mucoadhesive anterior segment ocular drug delivery", *Biomacromolecules*, vol.17, No4, pp.1449-1457, Apr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00054>
- [12] S. Liu, L. Jones, F. X. Gu, "Nanomaterials for ocular drug delivery", *Macromol Biosci*, vol.12, No5, pp.608-620, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201100419>
- [13] R. Gaudana, H. K. Ananthula, A. Parenky, A. K. Mitra, "Ocular drug delivery", *AAPS J*, vol.12, No3, pp.348-360, Sep. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9183-3>
- [14] D. Achouri, K. Alhanout, P. Piccerelle, V. Andrieu, "Recent advances in ocular drug delivery", *Drug Dev Ind Pharm*, vol.39, No11, pp.1599-1617, Nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.736515>
- [15] J. Araújo, E. Gonzalez, M. A. Egea, M. L. Garcia, E. B. Souto, "Nanomedicines for ocular NSAIDs: Safety on drug delivery", *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, vol.5, No4, pp.394-401, Dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.02.003>
- [16] A. Patel, K. Cholkar, V. Agrahari, A. K. Mitra, "Ocular drug delivery systems: An overview", *World J Pharmacol*,

vol.2, No2, pp.47-64, Jun. 2013.

DOI: <https://doi.org/10.5497/wip.v2.i2.47>

- [17] K. Cholkar, S. P. Patel, A. D. Vadlapudi, A. K. Mitra, "Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery", *J Ocul Pharmacol Ther*, vol.29, No2, pp.106-123, Mar. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1089/jop.2012.0200>
- [18] R. Gonzalez-Pizarro, P. Carvajal-Vidal, L. Halbault Bellowa, A.C. Calpena, M. Espina, M.L. Garcia, "In-situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions", *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol.175, pp.356-374, Mar. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.065>
-

류 재 국(Jae-Kuk Ryu)

[정회원]



- 1995년 2월 : 영남대학교 제약학과 (약학사)
- 1997년 8월 : 영남대학교 약학과 (약학석사)
- 2006년 8월 : 성균관대학교 제약학과 (약학박사)
- 1997년 7월 ~ 2012년 2월 : 한미약품 제제분석팀 팀장
- 2017년 3월 ~ 현재 : 동남보건대학교 식품제약과 조교수

〈관심분야〉

의약품분석, 약물전달체, 서방성제제